昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*，October 2006，49(5)：747 – 753 ISSN 0454-6296

黑腹果蝇抗真菌肽基因 *Drs* 和 *Drs-lC* 的原核可溶性表达及抗真菌活性测定

段 云[1]，邓小娟[1]，叶明强[1]，杨婉莹[1,*]，黄亚东[2]，温硕洋[3]，曹 阳[1]

（1. 华南农业大学动物科学学院蚕丝科学系，广州 510642；2. 暨南大学医药生物技术研究开发中心，广州 510632；3. 华南农业大学资源与环境学院昆虫学系，广州 510642）

摘要：Drosomycin（Drs）是第 1 个从黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 体内鉴定发现的昆虫抗真菌肽因子。它对细菌无明显的抗性，但对丝状真菌具有高效广谱的抑杀作用。此外，在黑腹果蝇基因组还存在着 Drs 的另外 6 个同系物的基因序列，其中同系物 Drosomycin-lC（Drs-lC）的抗真菌谱仅次于 Drs。将 Drs 抗真菌肽基因（*Drs*）和同系物 Drs-lC 基因（*Drs-lC*）进行可溶性表达，对果蔬等农产品防腐保鲜的研究有应用前景。本实验将 *Drs* 和 *Drs-lC* 分别克隆到硫氧还蛋白（Trx）融合表达载体 pThiohis A 中，转化宿主菌 TOP10，进行可溶性表达，并从诱导表达的菌液起始浓度、IPTG 的诱导浓度及诱导时间等方面进行了表达条件的优化。结果表明 2 种融合蛋白 Trx-Drs 和 Trx-Drs-lC 大部分以可溶形式表达，可溶性表达的 Trx-Drs 在上清液中约占菌体总蛋白的 22%。2 种融合蛋白的表达产物经 Ni-NTA 亲和层析得到纯化。生测结果表明，2 种融合蛋白分别对 8 种供试真菌中的 5 种真菌显示明显的抗性。

关键词：黑腹果蝇；抗真菌肽；原核表达；可溶性表达；抗真菌活性

中图分类号：Q966 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2006)05-0747-07

Soluble expression of the antifungal peptide genes, *Drs* and *Drs-lC*, of *Drosophila melanogaster* in the prokaryote and the detection of their antifungal activity

DUAN Yun[1], DENG Xiao-Juan[1], YE Ming-Qiang[1], YANG Wan-Ying[1,*], HUANG Ya-Dong[2], WEN Shuo-Yang[3], CAO Yang[1] (1. Department of Sericulture Science, College of Animal Science, South China of Agricultural University, Guangzhou, 510642, China; 2. Biopharmaceutical Research and Development Center, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 3. Department of Entomology, College of Natural Resource and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Drosomycin (Drs) is the first insect antifungal peptide from *Drosophila melanogaster* which showed a broad activity against filamentous fungi but no activity to bacteria. Besides the Drs, there are six gene sequences of Drs isoforms in the genome of *D. melanogaster*. Among them, only the activity of Drosomycin-like C (Drs-lC) was close to Drs. The soluble expression of the antifungal peptide genes *Drs* and *Drs-lC* may be applied in the preservation of agricultural products such as fruits and vegetables. In this paper, the genes of *Drs* and *Drs-lC* were respectively inserted into the fusion vector pThiohis A containing thioredoxin (Trx) and solubly expressed after the recombinant vectors were transformed into TOP10. The conditions of the expression including the starting concentration of the bacteria induced, the inductive concentration of IPTG and the incubation time after induction were optimized. The results showed that the fusion proteins, Trx-Drs and Trx-Drs-lC, were expressed as soluble proteins. The soluble expression level of Trx-Drs in the supernate amounted to 22% of the total proteins of bacteria. The expressed products of fusion proteins were purified by Ni-NTA. The results of antifungal activity detection indicated that the fusion proteins, Trx-Drs and Trx-Drs-lC, showed

基金项目：国家重点基础研究发展计划‘973’项目(2005CB121000)；广东省科学技术计划重点项目(2003C104042)；广东省自然科学基金项目(010294，032256，04020553)

作者简介：段云，女，1981 年 11 月生，硕士，从事昆虫生化与分子生物学研究，E-mail：duanyuan0928@sina.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail：ywyrose@163.com

收稿日期 Received：2005-12-28；接受日期 Accepted：2006-06-24

obvious activity against five of the eight tested fungi.

Key words: *Drosophila melanogaster*; antifungal peptide; prokaryotic expression; soluble expression; antifungal activity

昆虫抗微生物肽(insect antimicrobial peptide)具有抗菌高效、广谱,热稳定性好,对人畜安全无毒等特点(黄自然等,2000),近年来将昆虫抗微生物肽用于生物制药和果蔬等农产品防腐保鲜的应用研究已成为国内外关注的热点之一。但是,由于昆虫体内免疫诱导产生的抗微生物肽产量很低,从机体中提取的步骤繁琐,价格昂贵及对某些酶极不稳定等缺点(翁宏飚等,2003),成为上述研究的技术瓶颈。要使昆虫抗微生物肽用于果蔬等农产品的防腐保鲜,关键是降低成本。采用基因工程的方法,对昆虫抗微生物肽基因进行分泌型或可溶性表达,将表达产物的上清粗提液直接作为防腐保鲜制剂或添加剂,是解决上述问题的有效途径之一。

Drosomycin(Drs)是第 1 个从黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 中分离鉴定的抗真菌肽(antifungal peptide)因子(Fehlbaum *et al*., 1994),由 44 个氨基酸残基组成,分子内含 8 个半胱氨酸残基,形成 4 个二硫键。Drs 对丝状病原真菌具有高效的抗性,适用于防止病原真菌导致的果蔬等农产品霉变的保鲜处理。在黑腹果蝇基因组全测序完成(Adams *et al*., 2000)以后,经注释发现在黑腹果蝇基因组中还有另外 6 个 Drs 同系物的基因存在(Khush and Lemaitre, 2000)。本实验室在最近的研究中,将 *Drs* 和它的 6 个同系物基因(*Drs-lC*、*Drs-lD*、*Drs-lE*、*Drs-lF*、*Drs-lG* 和 *Drs-lI*)分别克隆到 pET-3C 表达载体,在大肠杆菌中进行了表达,并对表达产物进行了纯化和抗真菌活性鉴定,结果显示 Drs 和它的 6 个同系物存在明显的抗性差异,其中同系物 Drs-lC 的抗真菌谱仅次于 Drs(Yang *et al*., 2006)。但是在 pET-3c 载体中,Drs 及其同系物主要以包涵体形式表达,必需进行分离纯化和复性,才能得到有活性的表达产物,这样不利于低成本用于果蔬等农产品的防腐保鲜。

如果对昆虫抗真菌肽基因进行分泌型或可溶性表达,上清粗提液能够达到抗真菌活性,则可以符合防腐保鲜的低成本要求。Michaut 等(1996)曾将 *Drs* 基因与 *Mfal* 基因融合后在酵母中进行分泌表达,本课题组最近利用酵母表达载体 pPICZ αA 分泌表达了 *Drs*、*Drs-lC* 和斑腹刺益蝽 *Podisus maculiverntris* 抗真菌肽 *Thanatin* 基因。作者利用硫氧还蛋白(thioredoxin, Trx)表达载体 pThiohis A,将 *Drs*、*Drs-lC* 与 *Trx* 进行可溶性融合表达,为今后进行果蔬等农产品防腐保鲜的应用研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株及试剂

宿主菌 *E. coli* TOP10 和表达质粒 pThiohis A 由华南农业大学生命科学学院李晓瑜博士赠送。长柄链格孢菌 *Alternaria longipe*、粗糙脉孢菌 *Neurospora crassa* Shear *et* Dodge 购自中国科学院微生物研究所微生物菌种保藏中心。尖孢镰孢菌 *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. cubense、辣椒炭疽病菌 *Colletotrichum capsici* Butl、水稻立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani*、小麦赤霉菌 *Fusarium graminerum* Schw 为华南农业大学资源与环境学院真菌研究室姜子德教授和习平根博士赠送。黄僵菌 *Beauveria bassiana* 和胶孢炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporiorides* 由本系生物技术实验室保存。

限制性内切酶购自大连宝生物工程公司。E.Z.N.A 质粒小量提取试剂盒、E.Z.N.A PCR 产物回收试剂盒和 E.Z.N.A 胶回收试剂盒均购自 Omega 公司。Ni-NTA 亲和层析凝胶购自 Qiagen 公司。

1.2 引物设计与 PCR 扩增

根据 GenBank 登录的 *Drs*(NM079177)和 *Drs-lC*(AY225091)的核苷酸序列,由于它们成熟肽两端的核苷酸序列相同,可设计 1 对引物,从本实验室已构建的重组质粒 pET-Drs 和 pET-lC 上 PCR 扩增获得 *Drs* 和 *Drs-lC* 基因片段。上游引物 Drs1:5′-CAA<u>GGTACC</u>TGACTGCCTGTCCGGAAG-3′,下游引物 Drs2:5′-GCA<u>GAGCTC</u>TTAGCATCCTTCGCACC-3′(下划线部分别为 *Kpn* Ⅰ、*Sac* Ⅰ 酶切位点,引物由上海生物工程有限公司合成)。PCR 反应参数为 94℃ 变性 5 min 后 94℃ 1.5 min,62℃ 50 s,72℃ 1 min,共 30 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min,4℃ 保存备用。

1.3 重组质粒 pThiohis-Drs 和 pThiohis-C 的构建

PCR 扩增得到的目的基因 *Drs* 和 *Drs-lC* 分别经 *Kpn* Ⅰ 和 *Sac* Ⅰ 双酶切后连接到 pThiohis A 载体上,并转化到宿主菌 TOP10 中,具体操作方法参考 Sambrook 等(1992)。将 PCR 鉴定和酶切鉴定为阳性

的菌株送至上海生物工程有限公司进行测序，获得重组质粒 pThiohis-Drs 和 pThiohis-C。

1.4　对融合蛋白诱导表达条件的优化

分别从平板上挑取含重组质粒 pThiohis-Drs 和含空载体 pThiohis A 的 TOP10 菌，接种于 3 mL 的 LB 液体培养中(含 100 mg/mL Amp)，37℃、250 r/min 振荡培养过夜；然后按 2%的体积转接于 10 mL LB 液体培养基中，37℃ 250 r/min 振摇培养 3 ~ 4 h，使其 OD_{600} 分别达到 0.6、0.8、1.0、1.2 时，加入 IPTG(终浓度为 1.0 mmol/L)诱导培养 5 h 后取样，进行 SDS-PAGE，检测 IPTG 诱导时菌液起始浓度对融合蛋白表达的影响。

按上述培养方法，使菌液的 OD_{600} 为 0.6 时，加入不同浓度的 IPTG，使其终浓度分别为 0 、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0、2.2、2.4、2.6 mmol/L，诱导培养 5 h 后取样进行 SDS-PAGE，检测 IPTG 浓度对融合蛋白表达的影响。

培养至菌液 OD_{600} 为 0.6 时，加入终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG，分别在诱导后培养 0 h、1 h、2 h、3.5 h、4 h、4.5 h、5 h、5.5 h 取样进行 SDS-PAGE，检测诱导时间对融合蛋白表达的影响。

1.5　融合蛋白的可溶性分析

按 1.4 节中确定的培养条件，对含重组质粒 pThiohis-Drs 和 pThiohis-C 的 TOP10 进行大量诱导培养后，加入 1/30(V/V)的 4℃ 预冷的裂解缓冲液(0.65 mol/L NaH_2PO_4，0.5 mol/L NaCl，10 μmol/L 咪唑，pH 8.0)，悬浮菌体，冰浴 30 min 后超声处理(超声 30 min，每次 5 s，间隔 9 s，功率 800 W)至菌体完全破碎，在 4℃、10 000 r/min 离心 30 min，分别取上清液和沉淀，进行 SDS-PAGE 检测，对表达的 Trx-Drs 和 Trx-Drs-lC 融合蛋白进行可溶性分析。

1.6　融合蛋白的分离纯化

对 Trx-Drs 和 Trx-Drs-lC 融合蛋白表达产物的纯化，参照 Qiagen 公司的 Ni-NTA Matric 操作手册进行。含重组质粒 pThiohis-Drs 和 pThiohis-C 的细菌破碎液上样于 Ni-NTA 纯化柱，调整流速(≤1.5 mL/min)后，用裂解缓冲液、洗脱缓冲液(0.65 mol/L NaH_2PO_4，0.5 mol/L NaCl，40 μmol/L 咪唑，pH 8.0)和溶解缓冲液(0.65 mol/L NaH_2PO_4，0.5 mol/L NaCl，8% 咪唑，pH 8.0)洗脱柱子，取各个部分洗脱液 15 μL，进行 SDS-PAGE 检测。

将上述经 Ni-NTA 层析纯化后的样品用 Sephadex G-10 层析介质进行脱盐处理，用 0.05 mol/L 的醋酸铵缓冲液洗脱 Sephadex G-10 层析柱，洗脱速度为 3 mL/min，收集洗脱峰。将经脱盐处理的蛋白样品冻干，于 －80℃保存备用。

1.7　抗真菌活性检测

用抑菌圈法测试融合蛋白对真菌菌丝的抑制活性，操作方法见刘颖等(1999)。接种供试真菌于直径为 9 cm 的 PDA 平板上，25 ~ 28℃倒置培养至菌丝直径为 1.5 ~ 2 cm，在菌丝前方分别加 30 μL 已纯化的融合蛋白样品 Trx-Drs 和 Trx-Drs-lC，同时以无菌水作为对照。将平板室温放置 3 ~ 4 h，然后于 25 ~ 28℃倒置培养 24 ~ 48 h，观察并记录抑菌结果。

采用琼脂渗透法测试融合蛋白对真菌孢子的抑制作用，操作方法见徐进署和张双全(2001)以及 Saito 等(2004)。在 50℃左右的 15 mL PDA 培养基中加入 60 μL 真菌孢子液(浓度为 3×10^5 个/ mL)，迅速混匀后倒入直径 9 cm 的平板内，待凝固后打孔(直径 4 mm)，分别在孔中加入 20 μL 已纯化的融合蛋白样品，以无菌水作为对照。将平板于 4℃冰箱放置 5 h，待样品充分扩散到培养基中，25 ~ 28℃倒置培养 24 ~ 48 h。测定抑菌圈直径，计算抗菌活性单位，计算方法根据杨云霞等(2003)报道的公式：抗菌活性单位(U) = (抑菌圈直径 mm － 打孔器直径 4 mm) × 10。

2　结果与分析

2.1　重组质粒的鉴定

用 *Kpn* Ⅰ和 *Sac* Ⅰ对重组质粒 pThiohis-Drs 和 pThiohis-C 进行 PCR 和酶切鉴定。从图 1 中可以看出，用载体上通用引物进行 PCR 鉴定可以扩增出 1 条大约 330 bp 的带，符合预计目的带的大小。图 2 所示的酶切条带大小约为 150 bp，与文献报道的 *Drs* 及 *Drs-lC* 基因成熟肽序列的大小一致。对经 PCR 和酶切鉴定后的质粒进行测序，结果表明目的基因 *Drs* 和 *Drs-lC* 已插入到 pThiohis A 载体中，阅读框正确。

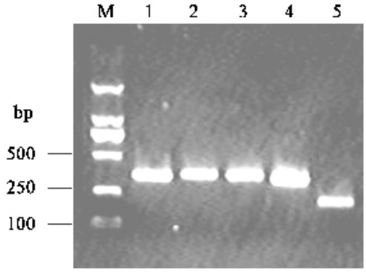

图 1　重组质粒的 PCR 鉴定

Fig. 1　PCR analysis of the recombinant plasmid

M：DL2000；1，2：pThiohis-Drs；3，4：pThiohis-C；5：pThiohis A.

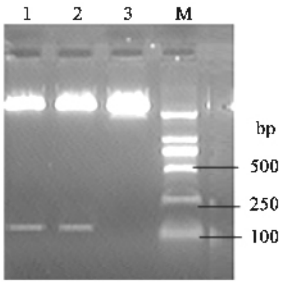

图 2 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 2 Enzyme digestion analysis of the recombinant plasmid

M：DL2000；1：pThiohis-Drs；2：pThiohis-C；3：pThiohis A.

2.2 对融合蛋白诱导表达条件的优化

选取鉴定后的含重组质粒 pThiohis-Drs **的克隆，分别从** IPTG **诱导时的细菌起始浓度、**IPTG **的诱导浓度和诱导后的培养时间等方面进行诱导表达条件的优化。电泳检测的结果(图** 3～6)**表明：融合蛋白表达的分子量约为** 17.5 kD**，符合预期结果；**IPTG **诱导时细菌的起始浓度在** OD_{600} **为** 0.6 **时的融合蛋白表达量较高(图** 3)**；用** 1.0 mmol/L **的** IPTG **诱导培养** 4～5 h **的融合蛋白表达量相对较高(图** 4～6)**。由此确定适宜的诱导培养条件为** 37℃ **培养、细菌起始浓度** OD_{600} **值为** 0.6 **时，用** 1.0 mmol/L **的** IPTG **诱导培养** 4～5 h**。**

2.3 融合蛋白的可溶性分析

大量离心收集上述条件下诱导培养的 2 **种重组菌体，加入细菌裂解缓冲液后，进行超声波裂解细胞，离心后分别收集上清液和沉淀进行** SDS-PAGE **检测。图** 7 **示例了** Drs-Trx **融合蛋白的可溶性分析结果，采用灰度扫描法测得在上清液中(图** 7：4)**可溶性表达的融合蛋白** Trx-Drs **占菌体总蛋白的** 22% **左右，而在沉淀中目的蛋白的含量则相对较少(图** 7：3)**。**

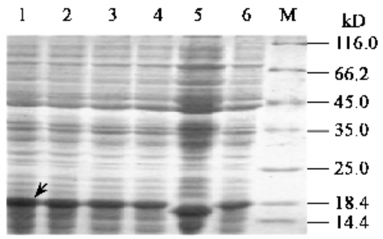

图 3 菌液起始浓度对 pThiohis-Drs **表达的影响**

Fig. 3 The starting concentration of infection to the expression of pThiohis-Drs

M：**蛋白分子量标准** Protein molecular weight standard；1－4，6：**在菌液起始浓度的** OD_{600} **值分别为** 0.6、0.8、1.0、1.2、1.5 **时** pThiohis-Drs **的表达** Expression of pThiohis-Drs at the starting concentrations of OD_{600} 0.6，0.8，1.0，1.2，and 1.5，respectively；5：pThiohis A **的表达** Expression of pThiohis A.

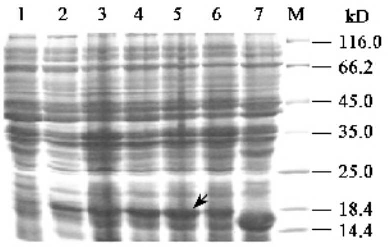

图 4 IPTG **诱导浓度对** pThiohis-Drs **表达的影响**

Fig. 4 Infection of IPTG concentration to the expression of pThiohis-Drs

M：**蛋白分子量标准** Protein molecular weight standard；1－6：IPTG **诱导浓度分别为** 0、0.2、0.4、0.6、0.8 and 1.0 mmol/L **时** pThiohis-Drs **的表达** Expression of pThiohis-Drs induced by different IPTG concentrations of 0，0.2，0.4，0.6，0.8，and 1.0 mmol/L，respectively；7：pThiohis A **的表达** Expression of pThiohis A.

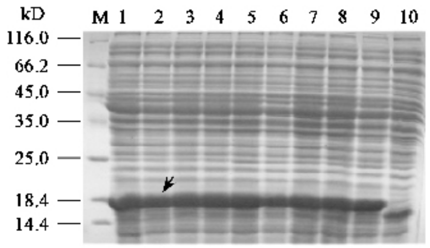

图 5 IPTG **诱导浓度对** pThiohis-Drs **表达的影响**

Fig. 5 Infection of IPTG concentration to the expression of pThiohis-Drs

M：**蛋白分子量标准** Protein molecular weight standard；1－9：IPTG **诱导浓度分别为** 1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0、2.2、2.4、2.6 mmol/L **时** pThiohis-Drs **的表达** Eexpression of pThiohis-Drs induced by different IPTG concentrations of 1.0，1.2，1.4，1.6，1.8，2.0，2.2，2.4，and 2.6 mmol/L，respectively；10：pThiohis A **的表达** Expression of pThiohis A.

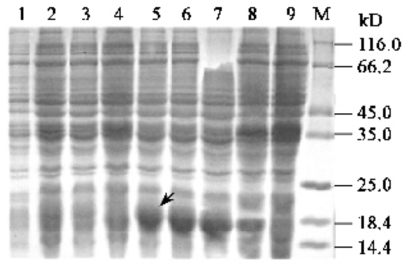

图 6 培养时间对 pThiohis-Drs **表达的影响**

Fig.6 Infection of induced time to the expression of pThiohis-Drs

M：**蛋白分子量标准** Protein molecular weight standard；1－8：**分别为诱导** 0、1.0、2.0、3.0、4.0、4.5、5.0、5.5 h **后** pThiohis-Drs **的表达** Expression of pThiohis-Drs induced for 0，1.0，2.0，3.0，4.0，4.5，5.0，and 5.5 h，respectively；9：pThiohis A **的表达** Expression of pThiohis A after being induced.

2.4 融合蛋白的分离纯化

对细菌裂解液的上清液用 Ni-NTA **层析柱纯化后进行** SDS-PAGE **检测，用灰度扫描法进行蛋白泳**

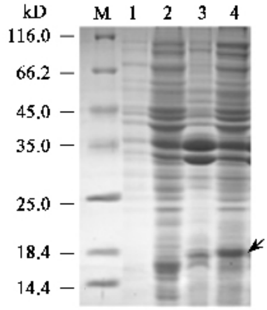

图 7　Drs-Trx 融合蛋白的可溶性表达分析

Fig. 7　Analysis of the soluble expression of fusion protein Drs-Trx

M:蛋白分子量标准 Molecular weight standard;1,2:分别为 pThiohis A 细胞裂解液的上清液和沉淀 The supernate and the deposits of the crashed pThiohis A cell;3:pThiohis-Drs 细胞裂解液的沉淀 The deposits of the crashed pThiohis-Drs cell;4:pThiohis-Drs 细胞裂解液的上清液 The supernate of the crashed pThiohis-Drs cell.

带谱的扫描,测得纯化后的 Trx-Drs 融合蛋白可达 82.5%(图 8:5)。

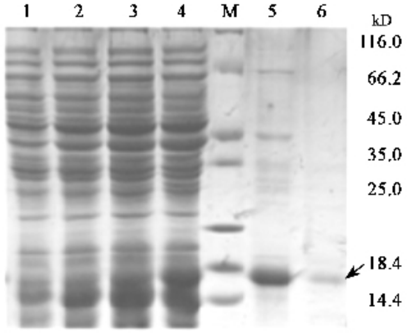

图 8　Drs-Trx 融合蛋白的 Ni-NTA 纯化

Fig. 8　Purification of the fusion protein Trx-Drs with Ni-NTA

M:蛋白分子量标准 Molecular weight standard;1,2:在裂解缓冲液中洗脱的泳带 The washed bands in the lysis buffer;3,4:在洗脱缓冲液中洗脱的泳带 The washed bands in the wash buffer;5,6:在溶解缓冲液中洗脱峰的泳带 The bands of the washed peaks in the elution buffer.

2.5　融合蛋白的抗真菌活性测定

将经 Ni-NTA 纯化、Sephadex G-10 层析脱盐处理的 Trx-Drs 和 Trx-Drs-lC 融合蛋白冻干样品用 ddH_2O 溶解,检测融合蛋白对供试真菌菌丝和孢子的抑制作用。对 8 种供试植物病原真菌菌丝的检测结果表明,2 种融合蛋白对长柄链格孢菌和尖孢镰孢菌菌丝有明显的抑制作用(图 9:a,b),但对胶孢炭疽菌和小麦赤霉菌(图 9:c,d)等其他 6 种供试真菌菌丝的抑制效果不明显。同样,对 8 种供试真菌孢子的抗性检测结果显示,Trx-Drs 和 Trx-Drs-lC 融合蛋白只对辣椒炭疽病菌、水稻立枯病菌及粗糙脉孢菌 3 种病原真菌的孢子有明显的抑制效果(图 10:a,b,c)(表 1),而对黄僵菌(图 10:d)等其他 5 种没有明显的效果。由表 1 抑菌圈直径可以看出,Trx-Drs 融合蛋白对所测的 3 种病原真菌孢子的抑制效果大于 Trx-Drs-lC 融合蛋白。

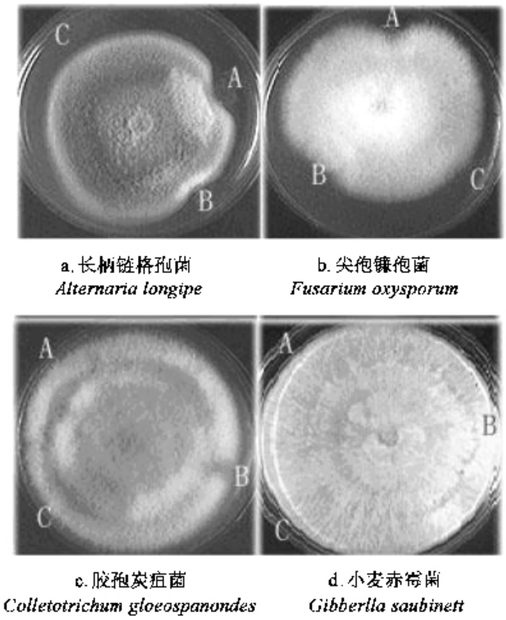

图 9　Trx-Drs 和 Trx-Drs-lC 融合蛋白对真菌菌丝的抑制效果

Fig. 9　Effects of fusion protein Trx-Drs and Trx-Drs-lC *in vitro* on the hyphals of fungi

A:Trx-Drs;B:Trx-Drs-lC;C:ddH_2O.

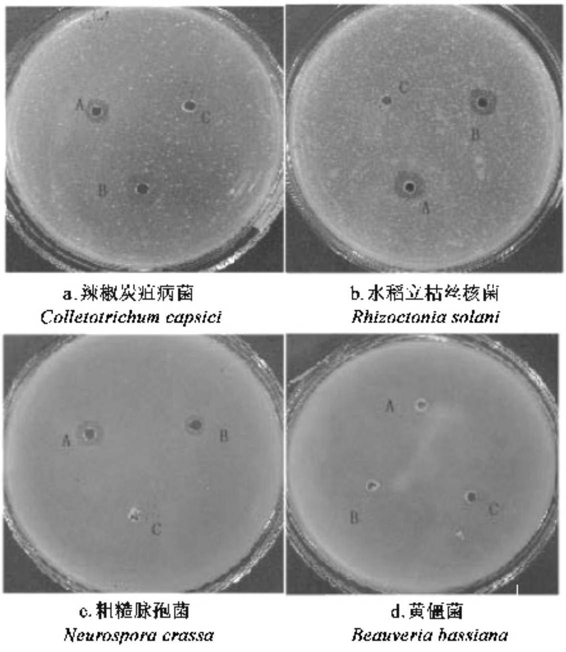

图 10　Trx-Drs 和 Trx-Drs-lC 融合蛋白对真菌孢子的抑制效果

Fig. 10　Effects of the fusion protein Trx-Drs and Trx-Drs-lC *in vitro* on the spores of fungi

A:Trx-Drs;B:Trx-Drs-lC;C:ddH_2O.

表 1 融合蛋白 Trx-Drs 和 Trx-Drs-lC 对 3 种植物病原真菌孢子的抑制圈

Table 1 Inhibition zone of the fusion protein Trx-Drs and Trx-Drs-lC *in vitro* on the spores of three phytopathogenic fungi

菌株孢子 Fungi spores	样品 Sample	抑菌圈直径(mm) Inhibition zone diameter	抗菌活性单位 Inhibition activity unit
水稻立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani*	Trx-Drs	11	70
	Trx-Drs-lC	9	50
	对照 CK	0	0
辣椒炭疽病菌 *Colletotrichum capsici*	Trx-Drs	13	90
	Trx-Drs-lC	10	60
	对照 CK	0	0
粗糙脉孢菌 *Neurospora crassa*	Trx-Drs	10	60
	Trx-Drs-lC	7	30
	对照 CK	0	0

3 讨论

目前大肠杆菌系统已经被广泛地用于外源基因的表达中。但在通常情况下,大肠杆菌细胞质内呈还原环境,不能形成二硫键,进而影响重组蛋白质的空间构象(童芹等,2001),重组蛋白大部分以包涵体的形式存在,导致分离纯化的困难和开发应用成本的增高。本研究中利用硫氧还蛋白融合表达系统 pThiohis A/TOP10,实现了对果蝇抗真菌肽基因 *Drs* 及其同系物基因 *Drs-lC* 的可溶性表达,可溶性表达的融合蛋白占菌体总蛋白的 22%左右,这将为以后在发酵液中进一步高效可溶性表达昆虫抗真菌肽蛋白提供技术储备。

结合 pThiohis A/TOP10 以高效可溶性地与硫氧还蛋白融合表达外源基因的特点(LaVallie *et al*., 1993;Elvira *et al*., 1997),本研究选用 Ni-NTA 亲和柱分离提纯 Trx-Drs 和 Trx-Drs-lC 融合蛋白,得到较好的纯化效果,Trx-Drs 融合蛋白的纯度可达到 82.5%左右。在我们对 *Drs* 及其 6 个同系物基因的克隆表达产物进行抗性测定的研究结果中表明,*Drs* 基因的克隆表达产物对所有供试的植物病原真菌都有非常强的抑制作用(Yang *et al*., 2006),其中包括本次测试中除胶孢炭疽菌和黄僵菌外的其他 5 种病原真菌。但是在本实验结果中,Trx-Drs 和 Trx-Drs-lC 融合蛋白的抗性谱却大大降低,这可能是 Drs、Drs-lC 分别与 Trx 融合表达后,Trx 影响了 Drs、Drs-lC 的空间结构而导致活性的改变。

将抗真菌肽用于果蔬等农产品的防腐保鲜,关键是降低成本。在本研究中虽然对果蝇抗真菌肽基因 *Drs*、*Drs-lC* 实现了原核可溶性高效表达,但仍然还有许多问题需要解决:一是表达的融合蛋白丧失了原有的部分活性,若要恢复原有活性,需经过肠激酶裂解切除融合的 Trx,这将导致成本的增加;二是本研究使用了 Ni-NTA 层析柱纯化培养液上清液中的 Drs、Drs-lC 融合蛋白,Ni-NTA 层析柱价格昂贵;三是在可溶性表达的培养液中如何防止宿主菌对目的蛋白的降解问题。

参 考 文 献 (References)

Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE, Li PW, 2000. The *Drosophila* genome review: The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287(24):2 185 – 2 195.

Mambetisaeva ET, Martin PE, Evans WH, 1997. Expression of three functional domains of connexin 32 as thioredoxin fusion proteins in *Escherichia coli* and generation of antibodies. *Protein Expression and Purification*, 11:26 – 34.

Fehlbaum P, Bulet P, Michaut L, Lagueux M, Broekaert WF, Hetru C, Hoffmann JA, 1994. Septic injury of *Drosophila* induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. *J. Biol. Chem*., 269(52):33 159 – 33 163.

Huang ZR, Liao FP, Zheng Q, Huang YD, 2000. Insect cecropin used as a new antibiotic in medicine. *Natural Product Research and Development*, 13(2):79 – 83. [黄自然, 廖富蘋, 郑青, 黄亚东, 2000. 昆虫抗菌肽在医药上的应用. 天然产物研究与开发, 13(2):79 – 83]

Khush RS, Lemaitre BL, 2000. Genes that flight infection: What the *Drosophila* genome says about animal immunity. *Trends in Genetics*, 16(10):442 – 449.

LaVallie ER, DiBlasio EA, Kovacic S, Grant KL, Schendel PF, McCoy JM, 1993. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Biotechnology*, 11:187 – 193.

Liu Y, Xu Q, Chen ZL, 1999. Purification and characterization of antifungal peptide LP-1. *Acta Microbiologica Sinica*, 39(5):441 – 447. [刘颖, 徐庆, 陈章良, 1999. 抗真菌肽 LP-1 的分离纯化及特性分析. 微生物学报, 39(5):441 – 447]

Michaut L, Fehlbaum P, Moniatte M, Dorsselaer AV, Reichhart JM, Bulet P, 1996. Determination of the disulfide array of the first inducible

antifungal peptide from insects: drosomycin from *Drosophila melanogaster*. *FEBS Letters*, 395: 6 – 10.

Saito A, Ueda K, Imamura M, Miura N, Atsumi S, Tabunoki H, Sato R, 2004. Purification and cDNA cloning of a novel antibacterial peptide with a cysteine-stabilized αβ motif from the longicorn beetle, *Acalolepta luxuriosa*. *Developmental and Comparative Immunology*, 28: 1 – 7.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (Translated by Jin DY, Li MF, Hou YD), 1992. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3nd ed. Beijing: Science Press. 16 – 66. [**萨姆布鲁克** J, **弗里奇** EF, **曼尼阿蒂斯** T (**金冬雁，黎孟枫，侯云德译**), 1992. **分子克隆：实验指南**. **第** 3 **版**. **北京：科学出版社**. 16 – 66]

Tong Q, Yang YG, Zhang HT, Chen Y, Yang SL, Gong Y, 2001. The thioredoxin reductase-deficient *E. coli* mutant enhances expression into solution of recombinant proteins containing cys residues. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 33(1): 30 – 34. [**童芹，杨运桂，张惠堂，陈燕，杨胜利，龚毅**, 2001. **硫氧还蛋白还原酶缺陷的大肠杆菌宿主促进含半胱氨酸残基的重组蛋白可溶性表达**. **生物化学与生物物理学报**, 33(1): 30 – 34]

Weng HB, Niu BL, Meng ZQ, Xu MK, 2003. Clone of antibacterial peptide Cecropin B gene and establishment of monitoring system for *in vivo* activity analysis. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 15(5): 273 – 279. [**翁宏飚，牛宝龙，孟智启，徐孟奎**, 2003. **抗菌肽** Cecropin B **基因的克隆及体内活性检测方法的构建**. **浙江农业学报**, 15(5): 273 – 279]

Xu JS, Zhang SQ, 2001. Antibacterial activity of antibacterial CM_4 against parasitical *Aspergillus*. *Natural Science Progress*, 11(12): 1 263 – 1 267. [**徐进署，张双全**, 2001. **抗菌肽** CM_4 **组分对寄生曲霉抗性机制的研究**. **自然科学进展**, 11(12): 1 263 – 1 267]

Yang WY, Wen SY, Huang YD, Ye MQ, Deng XJ, Han D, Xia QY, Cao Y, 2006. Functional divergence of six isoforms of antifungal peptide Drosomycin in *Drosophila melanogaster*. *Gene*, 379: 26 – 32.

Yang YX, Feng Y, Wang BY, 2003. Construction of a site-directed mutant of FALL-39 and antibacterial activity of its *E. coli*-based product. *Journal of Sichuan University* (*Med. Sci. Edi.*), 34(3): 390 – 394. [**杨云霞，冯云，王伯瑶**, 2003. **人抗菌肽** FALL-39 **基因定点突变体的构建及其大肠杆菌表达产物的抗菌活性研究**. **四川大学学报(医学版)**, 34(3): 390 – 394]

(责任编辑：黄玲巧)